

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5254682号
(P5254682)

(45) 発行日 平成25年8月7日(2013.8.7)

(24) 登録日 平成25年4月26日(2013.4.26)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 35/74 (2006.01) A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 P 17/16 (2006.01) A 6 1 P 17/16

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2008-168798 (P2008-168798)	(73) 特許権者	000006884
(22) 出願日	平成20年6月27日 (2008.6.27)		株式会社ヤクルト本社
(65) 公開番号	特開2010-6757 (P2010-6757A)		東京都港区東新橋1丁目1番19号
(43) 公開日	平成22年1月14日 (2010.1.14)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成22年2月1日 (2010.2.1)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経口摂取用皮膚性状改善剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビフィドバクテリウム・ブレーベを有効成分として含む、紫外線照射によって引き起こされる皮膚障害に対する改善又は予防のための経口摂取用皮膚性状改善剤（ただし飲食品を除く）。

【請求項2】

紫外線照射によって引き起こされる皮膚障害が、皮膚の肥厚、皮膚の弾力性低下、皮膚のキメの減少、皮膚のシワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加から選ばれる1種以上である請求項1に記載の皮膚性状改善剤。

【請求項3】

紫外線照射によって引き起こされる皮膚障害が、皮膚のシワ形成である請求項1又は2に記載の皮膚性状改善剤。

【請求項4】

紫外線照射によって引き起こされる皮膚障害が、経表皮水分蒸散量の増加である請求項1又は2に記載の皮膚性状改善剤。

【請求項5】

ビフィドバクテリウム・ブレーベが、生菌体及び/又は死菌体である請求項1～4のいずれか1項記載の皮膚性状改善剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、経口摂取用皮膚性状改善剤に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

人体最大の臓器である皮膚は、他臓器と比較して絶えず外部環境に接触する状態に置かれているため、様々な外的因子の影響を受けて様々な皮膚性状の異常が誘発される。

この外的因子の代表的なものとしては、紫外線を例示することができる。紫外線は、従来、生体内での骨形成に関与するビタミンDの生成に必要とされていたが、紫外線の過剰な暴露が皮膚の炎症や免疫抑制、酸化、DNA損傷等を引き起こし、その結果、特定の皮膚癌を誘導したり、或いはシワ形成や弾力性の低下を招くなど、皮膚の老化を速めるといった種々の問題を引き起こすことが報告されるようになり、これを防止する方法の必要性が生じている。

10

【 0 0 0 3 】

紫外線の暴露による多様な皮膚障害の改善のために用いられる方法としては、これまで皮膚科学に基づいた研究によって明らかとされた保湿作用や抗炎症作用などの機能性を有する動植物由来の素材、具体的には、多価アルコール、糖質、有機酸、アミノ酸、高分子物質等の保湿成分或いは角質細胞間脂質やその類縁物を各種の化粧品に配合し、外用剤として利用する方法が代表的なものとして知られている。(非特許文献1、特許文献1)

【 0 0 0 4 】

このような機能性素材を外用剤として利用する場合、局所における早期の改善効果は期待できるが、その効果が得られるのは、外用剤を塗布した場所に限られ、しかもその効果は、経時的に損なわれてしまうため、必ずしも十分とはいえなかった。また、皮膚に対する紫外線の影響は、角層や表皮層だけではなく、表皮層の下にある真皮層にも及ぶため、外用剤のみの利用だけではその効果には限界があった。

20

【 0 0 0 5 】

そこで、保湿作用や抗炎症作用等を有する動植物由来の天然の機能性素材を外用剤としてではなく、飲食品等の形態で、経口的に摂取することにより、紫外線等の外的因子に伴う皮膚性状の異常を改善しようとする方法も提案されている。(特許文献2)

【 0 0 0 6 】

そして、これまでに、乳酸菌を使用した経口的な摂取による皮膚に対して有益な効果を与える方法に関しては幾つかの報告がなされている。

30

例えば、皮膚の免疫機能のバランスを保つためにラクトバチルス・ジョンソニイやラクトバチルス・パラカゼイ等乳酸菌を使用する方法(特許文献3)が知られている。

また、皮膚の光防護のために、ラクトバチルス・ジョンソニイやラクトバチルス・パラカゼイの乳酸菌とカロテノイド誘導體又は酵母とを併用した経口摂取可能な組成物、更に当該乳酸菌等にビフィドバクテリウム・アドレセンティスを配合した経口用組成物が報告されているが、これら組成物の薬理試験方法及び薬理データは全く示されていない(特許文献4及び5)。

また、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ クレモリスH-61株の乳酸菌を含有する皮膚潰瘍発生抑制剤(特許文献6)、ラクトバチルス・ヘルペティカスにより乳を発酵させて得られる発酵乳ホエーを有効成分として含む経口摂取用保湿剤(特許文献7)等が知られている。

40

【 0 0 0 7 】

更に、様々な皮膚性状の改善についての要望があり、安全性が高く簡単に経口摂取できる、新たな皮膚性状改善剤が望まれている。

【 0 0 0 8 】

【特許文献1】特開昭63-192704号公報

【特許文献2】特開2001-252048号公報

【特許文献3】特表2004-510740号公報

【特許文献4】特表2005-526038号公報

50

【特許文献5】特表2005-525348号公報

【特許文献6】特開2006-256993号公報

【特許文献7】特開2005-206578号公報

【非特許文献1】関根茂等著、化粧品ハンドブック、日本ケミカルズ(株)他、P445-448、1996

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、経口的に摂取することによって皮膚性状を改善することができ、且つ継続的な経口摂取にも可能な安全性を有する新たな皮膚性状改善剤を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、全く意外にも、ビフィドバクテリウム属細菌を生菌体や死菌体の状態に関係なく、継続的に経口的に摂取した場合、皮膚性状、特に紫外線照射によって生じる様々な皮膚障害を改善または予防ができることを見出し、本発明を完成した。

【0011】

すなわち、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌を有効成分として含む経口摂取用皮膚性状改善剤を提供するものである。

20

また、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌がビフィドバクテリウム・プレーベである上記記載の皮膚性状改善剤を提供するものである。

【0012】

また、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム属細菌の生菌体及び/又は死菌体である上記記載の皮膚性状改善剤を提供するものである。

また、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・プレーベYIT4065株(FERM BP-6223)である上記記載の皮膚性状改善剤を提供するものである。

【0013】

更に、本発明は、皮膚性状改善が、紫外線照射によって引き起こされる皮膚障害に対する改善又は予防である上記記載の皮膚性状改善剤を提供するものである。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明の皮膚性状改善剤は、経口的に摂取することにより、優れた皮膚性状の改善効果、特に紫外線の照射を受けることによって生じる皮膚の肥厚、皮膚の弾力性の低下、皮膚のキメの減少、皮膚のシワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等の紫外線による皮膚障害に対して優れた改善または予防効果を得ることができる。

また、本発明の皮膚性状改善剤は、経口摂取可能なビフィドバクテリウム属細菌を有効成分として含有しているので安全性が高く、継続的な摂取を実現可能とし、しかもその菌の状態は生死に関係なく上記作用効果を発揮するので様々な指向に応じて摂取時の形態を設定することができ、経口用医薬品や飲食品として有用である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の皮膚性状改善剤は、経口的に摂取することが可能なビフィドバクテリウム属細菌を有効成分として含有する。

本発明の皮膚性状改善剤の有効成分として用いるビフィドバクテリウム属細菌としては、所望の皮膚性状改善効果、特に紫外線の照射を受けることによって生じる各皮膚障害に対する改善または予防効果を有するものであって、経口的に摂取可能であれば特に制限されることはない。

上記紫外線による皮膚障害の改善または予防としては、具体的には、皮膚の肥厚、皮膚の弾力性の低下、皮膚のキメの減少、皮膚のシワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等に対

50

する抑制、改善や予防が挙げられる。

【0016】

このビフィドバクテリウム属細菌のうち、ビフィドバクテリウム・ブレーベが好ましく、特にビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株が好ましい。

このビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株は、ヒトの腸内から単離され、整腸作用などの生理活性を有し、古くから発酵乳等の製造に用いられてきたものである。また、同菌株は、独立行政法人特許微生物寄託センターにFERM BP-6223として寄託されている（原寄託日：平成8（1996）年2月29日）。

【0017】

本発明で用いるビフィドバクテリウム属細菌の調製方法は、特に限定されるものではなく、常法に従って行えばよい。

例えば、本発明に用いるビフィドバクテリウム属細菌は、当該細菌の種菌を増殖可能な培地に接種して培養し、培養後遠心分離やろ過等の菌体を単離・精製する手段を用いて調製することができる。また、前記したとおり、当該細菌は、得られる生菌体をそのまま使用できる他、菌体を凍結乾燥した物、生菌体に加熱処理やアルコール処理等を施した死菌体或いは更にそれらを粉碎等の加工した物に調製し、使用できる。

また、ビフィドバクテリウム属細菌の調製の際に増殖可能な培地として経口的に摂取可能な培地を用いる場合には、当該細菌を含む培養物をそのまま或いは加熱処理などの加工処理を施したものを本発明の皮膚性状改善剤の有効成分として使用してもよい。

【0018】

ここで、ビフィドバクテリウム属細菌の増殖可能な培地としては、特に制限されるものではなく、有機・無機の各種栄養源から構成される栄養培地、例えば、GAM培地、MRS培地、BL培地等を挙げることができる。また、これ以外にも、牛乳、山羊乳等の獣乳や脱脂乳、粉乳、脱脂粉乳、生クリーム等の乳製品、豆乳、大豆粉等の大豆加工品を好適な培地として用いることができ、これらはそのまま或いは必要に応じて適当な濃度に希釈して使用すればよい。なお、培地のpHは、特に制限されない。

【0019】

一般に、ビフィドバクテリウム属細菌は、培地の種類によって、増殖性が必ずしも良好でない場合があるため、必要に応じて前記培地に、酵母エキス、大豆ペプチド、その他発酵助剤となり得る公知のビフィドバクテリウム属細菌の生育促進物質やビタミンC等の還元剤を添加することが好ましい。

【0020】

また、前記培地を用いたビフィドバクテリウム属細菌の培養は、通常の培養条件をそのまま適用すればよく、特に限定されるものではない。すなわち、培地に接種するビフィドバクテリウム属細菌に適した温度、時間、培養雰囲気等の各種条件を適宜設定して行えばよい。例えば、培養温度は、25～46℃、好ましくは35～42℃、培養時間は6～120時間、好ましくは24～72時間とすればよい。また、培養雰囲気は、嫌気的な条件で行うことが好ましく、培養方法については静置、攪拌、振盪等、特に制限されることはなく、いずれを選択してもよい。

【0021】

本発明の皮膚性状改善剤の有効成分として用いるビフィドバクテリウム属細菌について、これらの微生物の多くは、従来、ヨーグルト等の各種発酵食品の製造に用いられているので、プロバイオティクス（宿主の健康維持に有益な働きをする微生物）として広く知られており、常時経口的に摂取しても安全なものであり、後記実施例に示すように、紫外線の照射に伴う皮膚の肥厚、皮膚の弾力性の低下、キメの減少、シワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等の皮膚障害に対する改善または予防効果がみられたことから、紫外線による皮膚障害の改善または予防、そして皮膚性状の改善効果を目的とする医薬用途として利用できる他、各種の飲食品として摂取することができる。

また、本発明に用いるビフィドバクテリウム属細菌は、後記実施例に示すように、生菌体及び/又は死菌体の状態に関係なく、経口的に摂取することにより、上記所望の効果を

10

20

30

40

50

得ることができる。そのため、本発明で用いるビフィドバクテリウム属細菌は、必ずしも全て生菌体として用いる必要はなく、保存等による内外的な要因により、死滅した菌体を用いても上記所望の効果を得ることができるので、種々の加工を施した医薬用または飲食用の形態とすることができる。

【0022】

すなわち、当該ビフィドバクテリウム属細菌は、生菌体をそのままの状態皮膚性状改善剤として使用する他、例えば、生菌体の凍結乾燥物、加熱処理やアルコール処理等の殺菌処理を施した死菌体、当該菌体を含む培養物または更にこれらを加工した物を、皮膚性状改善剤として使用することができる。

【0023】

本発明の皮膚性状改善剤は、常法に従って、薬学的に許容される担体とともに種々の剤型の医薬組成物とすることができる。

例えば、上記菌株またはその加工物等に、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、アルギン酸ナトリウム、カテキン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム等の崩壊剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を加え、常法により顆粒剤、錠剤、カプセル剤等を製造することができる。更に、錠剤については、必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠或いは二重錠、多重錠とすることもできる。

【0024】

また、上記菌体またはその加工物等を食品に直接添加することにより、または、乳成分等の可食性の培地を用いた場合には、当該菌株を用いて発酵乳等の発酵食品を製造することにより、各種の飲食品として利用することができる。飲食品の好ましい例としては、ヨーグルト、チーズ、発酵乳、乳製品乳酸菌飲料、発酵豆乳、アイスクリーム、果汁飲料、スープ、クッキーなどを例示することができる。

【0025】

斯かる飲食品には、更に食品として通常用いられる種々の食品素材を配合することができる。具体的には、ショ糖、グルコース、フルクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース、麦芽糖等の糖質、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴などの糖アルコール、アスパルテーム、ソーマチン、スクラロース、アセスルファムK、ステビア等の高甘味度甘味料、寒天、ゼラチン、カラギーナン、グァーガム、キサンタンガム、ペクチン、ローカストビーンガム、ジェランガム、カルボキシメチルセルロース、大豆多糖類、アルギン酸プロピレングリコール等の各種増粘安定剤、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチンなどの乳化剤、クリーム、バター、サワークリーム等の乳脂肪、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、鉄、マンガン等のミネラル分を挙げるることができる。

【0026】

また、本発明の皮膚性状改善剤には、経口的に摂取することにより皮膚性状に有益な作用を与える素材を配合することができる。このような素材としては、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等のビタミン類、β-カロテン、α-カロテン、ルテイン等のカロテノイド、リノール酸、リノレン酸、EPA、DHA等の脂肪酸類、コラーゲン、ムコ多糖類、セラミド等の皮膚構成成分等を例示することができる。

【0027】

更に、本発明の皮膚性状改善剤には、経口摂取が可能であって生体に有益な機能を与える乳酸菌を含むものであってもよい。

このような乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidop*

10

20

30

40

50

hilus)、ラクトバチルス・ブレビス (Lactobacillus brevis)、ラクトバチルス・コリニフォルミス (Lactobacillus coryniformis)、ラクトバチルス・カルバタス (Lactobacillus curvatus)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシーズ ラクチス (Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis)、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシーズ ブルガリカス (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus)、ラクトバチルス・ファーメントム (Lactobacillus fermentum)、ラクトバチルス・ガリナラム (Lactobacillus gallinarum)、ラクトバチルス・ガセリ (Lactobacillus gasseri)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (Lactobacillus helveticus)、ラクトバチルス・ジョンソニー (Lactobacillus johnsonii)、ラクトバチルス・ケフィール (Lactobacillus kefir)、ラクトバチルス・マリ (Lactobacillus mali)、ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum)、ラクトバチルス・ペントーサス (Lactobacillus pentosus)、ラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei)、ラクトバチルス・サケイ (Lactobacillus sakei)、ラクトバチルス・ゼアエ (Lactobacillus zeae) 等のラクトバチルス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ ラクチス (Lactococcus lactis subsp. lactis)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris)、ラクトコッカス・プランタラム (Lactococcus plantarum) 等のラクトコッカス属細菌、ロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシーズ クレモリス (Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris)、ロイコノストック・ラクチス (Leuconostoc lactis) 等のロイコノストック属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) 等のストレプトコッカス属細菌、ペディオコッカス・アシディラクティシ (Pediococcus acidilactici)、ペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus)、ペディオコッカス・ハロフィラス (Pediococcus halophilus) 等のペディオコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) 等のエンテロコッカス属細菌を例示することができる。これらは、単独または2種以上併用してもよい。

【0028】

本発明の経口摂取可能な皮膚性状改善剤におけるビフィドバクテリウム属細菌の1回当たりの使用量は、服用する対象者の症状、年齢、体重等によっても異なるため、一概に決定することは出来ないが、およそ菌数として $10^3 \sim 10^{13}$ CFU 程度とすればよい。

また、本発明の皮膚性状改善剤の摂取開始時期や摂取期間等は特に制限はなく、紫外線照射に伴う皮膚障害の発生前後に経口的に摂取すればよいが、十分な効果を得るためには、紫外線の照射に伴う皮膚障害の発生等の有無に問わず、継続的に経口摂取することが好ましい。

【実施例】

【0029】

以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例になんら制約されるものではない。

【0030】

実施例 1

(皮膚性状改善剤の調製 1)

酵母エキス1%と、リン酸一カリウム10%、リン酸二カリウム20%、酢酸ナトリウム30%及び硫酸アンモニウム30%を含むミネラル液1%と、乳糖3%と、乳蛋白質5%とで調製した培地を2Lコルベンに1.5L作製し、121 で15分間加熱殺菌した。この培地にビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株 (FERM BP-6223) を1%接種し、水酸化ナトリウムでpHを5.5に保持しながら36 でおよそ20時間嫌氣的に培養して培養液を得た。この培養液を15,000×Gで遠心分離し、ビフィドバクテリウム属細菌の菌体を集菌した。

次に、乳蛋白質8%と糖質4%を含む分散液を100ml調製し、121 で15分間加熱殺菌した。これに、集菌したビフィドバクテリウム属細菌の菌体を湿重量当り15%分散させ、常法により凍結乾燥してビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株 (FERM BP-6223) の凍結

10

20

30

40

50

乾燥菌体を得た。この凍結乾燥菌体を 1.0×10^{10} cfu/mlとなるように生理食塩水10mlに懸濁し、以下の検証に供した。

【0031】

実施例2

(皮膚性状改善効果の検証1)

ヘアレスマウス(Hos:HR-1、メス、5週齢)を1週間馴化させた後、5匹ずつ合計3群に分けた。なお、UV+は紫外線照射有り、UV-は紫外線照射無しと、紫外線照射の有無を示す。

- 1: ブランク (UV-、生食水)
- 2: 対照群 (UV+、生食水)
- 3: 菌体投与群 (UV+、菌体液)

10

ブランクと対照群には生理食塩水を、菌体投与群には、実施例1で調製した凍結乾燥菌体懸濁液をそれぞれ胃ゾンデにより18日間0.1ml/day経口投与した。投与開始15日目から対照群および菌体投与群には紫外線照射装置(東芝SE-FL-20)により、40mJ/cm²/dayで紫外線を4日間(投与開始15~18日)照射した。

投与開始19日目に各群について、以下により、皮膚の厚さ、弾力性、キメ、シワ及び経表皮水分蒸散量を測定し、皮膚性状を検証した。その結果を図1~5に示す。

なお、凍結乾燥菌体懸濁液投与期間中のマウスの体重変化は、生理食塩水を投与した群と比較して有意な差は認められなかったため、凍結乾燥菌体懸濁液投与によるマウスの生育や健康状態に対する影響はないものと考えられた。

20

【0032】

(皮膚の厚さと弾力性)

皮膚の厚さは、thickness gauge (Digimatic indicator 543, Mitutoyo) を用いて、また、皮膚の弾力性は、Cutometer SEM575 (Courage+khazaka electronic GmbH) を用いてそれぞれ測定した。

【0033】

(キメとシワ)

マウスを台に固定し、背部皮膚から不透明の即乾性シリコンゴム (SILFLO、Flexico Developments) を塗布してネガティブレプリカを台紙に固定して作製した。次いで、常法に従って、ネガティブレプリカを30度の角度で落射照明して画像を入力し、二値化後、画像解析を行い、皮溝・皮丘数と面積比率を求めた。

30

なお、皮溝・皮丘数は、キメに関する指標であり、一定距離あたりにキメが何本存在するかを示す。また、面積比率は、シワに関する指標であり、一定面積あたりにシワが何%存在するかを示す。

【0034】

(経表皮水分蒸散量)

皮膚における経表皮水分蒸散量は、Tewa meter TM210 (Courage+khazaka electronic GmbH) を用いて測定した。

【0035】

図1及び2に示すとおり、対照群では、紫外線照射により、皮膚が肥厚し、弾力性も低下するのに対し、菌体投与群では、皮膚の肥厚が抑制され、弾力性の低下も有意に改善された。また、図3及び4に示すとおり、対照群では、紫外線照射により、肌のキメやシワの状態を表す指標である皮溝・皮丘数や面積比率が悪化するのに対し、菌体投与群ではいずれの指標も有意に改善された。更に、図5に示すとおり、対照群では、紫外線照射により、経表皮水分蒸散量が亢進し、表皮バリア機能が低下するのに対し、菌体投与群では、経表皮水分蒸散量の亢進が抑制され、表皮バリア機能の低下が有意に改善された。

40

以上の通り、ピフィドバクテリウム属細菌を経口的に摂取することにより、紫外線照射によって生じる皮膚の肥厚、弾力性の低下、キメの減少、シワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等の皮膚性状の悪化を有意に改善する効果が認められた。

【0036】

50

実施例 3

(皮膚性状改善効果の検証 2)

実施例 1 と同様の方法でビフィドバクテリウム属細菌を培養し、菌体を集菌した。この菌体を 1.0×10^{10} cfu/ml となるように生理食塩水に懸濁し、菌体懸濁液とした。実施例 1 で調製した菌体懸濁液に代えてこの菌体懸濁液を用いた以外は、実施例 2 と同様の方法により、皮膚性状を検証した。その結果を下表 1 に示す。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

	ブランク	対照群	菌体投与群
皮膚の厚さ (mm)	0.383±0.034	0.573±0.078	0.437±0.029
弾力性 (%)	60.4±16	35.8±4.8	56.2±13
キメ (N/cm)	73.8±3.5	65.8±2.9	72.2±3.3
シワ (%)	0.742±0.35	7.26±2.6	2.78±1.2
経表皮水分蒸散量 (g/m ² /h)	5.83±0.86	9.51±0.40	7.14±0.82

10

【 0 0 3 8 】

表 1 のとおり、実施例 2 と同様に、紫外線照射によって生じる皮膚の肥厚、弾力性の低下、キメの減少、シワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等の皮膚性状の悪化を改善する効果が認められ、これらの効果は、ビフィドバクテリウム属細菌を経口的に摂取することにより得られるものであることが確認された。

20

【 0 0 3 9 】

実施例 4

(皮膚性状改善剤の調製 2)

実施例 1 と同様の方法で分散液を用いて調製したビフィドバクテリウム・プレーベYIT4 065株 (FERM BP-6223) の凍結乾燥菌体を得た。この凍結乾燥菌体を 1.0×10^{10} cfu/ml となるように生理食塩水に懸濁し、生菌体液とした。また、この生菌体液を 100 で 30 分間加熱したものを死菌体液とし、それぞれ以下の検証に供した。

【 0 0 4 0 】

30

実施例 5

(皮膚性状改善効果の検証 3)

ヘアレスマウス (Hos:HR-1、メス、5週齢) を一週間馴化させた後、5匹ずつ合計 4 群に分けた。なお、UV± は、前述のとおり紫外線照射の有無を示す。

- 1 : ブランク (UV -、生食水)
- 2 : 対照群 (UV +、生食水)
- 3 : 生菌投与群 (UV +、生菌体液)
- 4 : 死菌投与群 (UV +、死菌体液)

ブランクおよび対照群には生理食塩水を、生菌および死菌投与群には、実施例 4 で調製した生菌体懸濁液および死菌体懸濁液をそれぞれ胃ゾンデにより 14 日間 0.1ml/day 経口投与した。投与開始 11 日目から対照群、生菌および死菌投与群には紫外線照射装置 (東芝 SE-FL-20) により、40mJ/cm²/day で紫外線を 4 日間 (投与開始 11 ~ 14 日) 照射した。投与開始 15 日目に各群について、前記実施例 2 と同様に、皮膚の厚さ、弾力性、キメ、シワ及び経表皮水分蒸散量を測定し、皮膚性状を検証した。その結果を図 6 ~ 10 に示す。

40

【 0 0 4 1 】

生菌または死菌投与群のいずれも、対照群に比べ、紫外線照射による皮膚の肥厚を抑制し、弾力性の低下も改善した (図 6 及び 7)。更に対照群に比べ、紫外線照射による肌のキメやシワの状態を表す指標である皮溝・皮丘数や面積比率の悪化を改善 (図 8 及び 9) し、また、経表皮水分蒸散量の増加を抑制して表皮バリア機能の低下を改善 (図 10) した。

このことから、本発明の皮膚性状改善剤は、有効成分として含有するビフィドバクテリ

50

ウム属細菌の生死状態に関係なく、経口的に摂取することにより、紫外線照射によって生じる皮膚の肥厚、弾力性の低下、キメの減少、シワ形成及び経表皮水分蒸散量の増加等の皮膚性状の悪化を有意に改善する効果が得られることが確認された。

【 0 0 4 2 】

実施例 6

(皮膚性状改善効果の検証 4)

ヘアレスマウス (Hos:HR-1、メス) を一週間馴化させた後、以下の通り、紫外線照射前の投与日数に応じた3系統で、5匹ずつ対照群と生菌投与群の2群に分けた。なお、UV+ は、前述のとおり紫外線照射有りを示す。

前投与期間0日〔投与開始直後から4日間UV照射〕

- 1 : 対照群 (UV+、生食)
- 2 : 生菌投与群 (UV+、生菌体液)

前投与期間5日〔投与開始6日目から4日間UV照射〕

- 3 : 対照群 (UV+、生食)
- 4 : 生菌投与群 (UV+、生菌体液)

前投与期間10日〔投与開始11日目から4日間UV照射〕

- 5 : 対照群 (UV+、生食)
- 6 : 生菌投与群 (UV+、生菌体液)

対照群には生理食塩水を、生菌投与群には、実施例 4 で調製した生菌体懸濁液をそれぞれ胃ゾンデにより各系統の投与日数に応じて、0.1ml/day経口投与した。各群、設定した紫外線照射前の投与日数が経過した後、試料の投与と並行して紫外線照射装置 (東芝SE-F L-20) により、40mJ/cm²/dayで紫外線を4日間照射した。

紫外線照射期間終了後、各群について、前記実施例 2 と同様に、皮膚の厚さ、弾力性、キメ、シワ及び経表皮水分蒸散量を測定し、皮膚性状を検証した。なお、皮膚性状の測定は、全ての系統でマウスが8週齢となるように行った。

その結果を図 1 1 ~ 1 5 の各 (A) に示す。また、紫外線照射前投与期間別に比較した結果を図 1 1 ~ 1 5 の各 (B) に示す。

【 0 0 4 3 】

図 1 1 (A) に示す通り、生菌投与群では、対照群に比べ、紫外線照射による皮膚の肥厚が抑制された。また、図 1 1 (B) に示すとおり、紫外線照射前投与期間別に比較すると、投与期間を5日以上設けることでその効果が高まることが明らかとなった。

【 0 0 4 4 】

次に、図 1 2 (A) に示す通り、生菌投与群では、対照群に比べ、皮膚の弾力性の低下が改善された。また、図 1 2 (B) に示すとおり、紫外線照射前投与期間別に比較すると、その効果が投与期間に依存的に高まることが明らかとなった。

【 0 0 4 5 】

また、図 1 3 (A) に示す通り、生菌投与群では、対照群に比べ、肌のキメの状態を表す指標である皮溝・皮丘数の減少を抑制する効果が認められた。また、図 1 3 (B) に示すとおり、紫外線照射前投与期間別に比較すると、その効果が投与期間に依存的に高まることが明らかとなった。

【 0 0 4 6 】

更に、図 1 4 (A) に示す通り、生菌投与群では、対照群に比べ、シワ形成の指標となる面積比率の増加を抑制する効果が認められた。そして、その効果は、紫外線照射前投与期間別に比較しても、図 1 4 (B) に示すとおり、投与期間に依存的に高まる傾向が認められた。

【 0 0 4 7 】

最後に、図 1 5 (A) に示す通り、生菌投与群では、対照群に比べ、紫外線による経表皮水分蒸散量の増加を抑制して表皮バリア機能の低下を改善する効果が認められた。また、図 1 5 (B) に示すとおり、紫外線照射前投与期間別に比較すると、投与期間を5日以上設けることでその効果が高まることが明らかとなった。

【 0 0 4 8 】

以上の通り、本発明の皮膚性状改善剤は、紫外線照射前の投与期間を長く設けることにより、各種皮膚パラメータに対する改善効果が高まることから、継続的な摂取を行うことにより、優れた皮膚性状改善効果を期待することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 9 】

【 図 1 】 実施例 2 の皮膚の厚さに及ぼす菌体投与の効果を示す。 ** : $p < 0.01$ (vs 対照群)

【 図 2 】 実施例 2 の皮膚の弾力性に及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 3 】 実施例 2 の皮溝・皮丘数を指標とするキメに及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 4 】 実施例 2 の面積比率を指標とするシワに及ぼす菌体投与の効果を示す。 ** : $p < 0.01$ (vs 対照群)

【 図 5 】 実施例 2 の経表皮水分蒸散量に及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 6 】 実施例 5 の皮膚の厚さに及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)、*** : $p < 0.001$ (vs 対照群)

【 図 7 】 実施例 5 の皮膚の弾力性に及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 8 】 実施例 5 の皮溝・皮丘数を指標とするキメに及ぼす菌体投与の効果を示す。 ** : $p < 0.01$ (vs 対照群)、*** : $p < 0.001$ (vs 対照群)、+ : $p < 0.05$ (vs 生菌投与群)

【 図 9 】 実施例 5 の面積比率を指標とするシワに及ぼす菌体投与の効果を示す。 * : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 1 0 】 実施例 5 の経表皮水分蒸散量に及ぼす菌体投与の効果を示す。 ** : $p < 0.01$ (vs 対照群)、*** : $p < 0.001$ (vs 対照群)

【 図 1 1 】 実施例 6 の紫外線照射前投与期間の違いが皮膚の厚さに及ぼす影響を示す。 * : < 0.05 、** : < 0.01 、**** : < 0.0001 なお、(A) は、実測値を示し、(B) は、対応する投与日数の対照群を 100% とした場合の対照群に対する生菌投与群の比を表す。

【 図 1 2 】 実施例 6 の紫外線照射前投与期間の違いが皮膚の弾力性に及ぼす影響を示す。 * : < 0.05 、*** : < 0.001 、**** : < 0.0001 なお、(A) は、実測値を示し、(B) は、対応する投与日数の対照群を 100% とした場合の対照群に対する生菌投与群の比を表す。

【 図 1 3 】 実施例 6 の紫外線照射前投与期間の違いが皮溝・皮丘数を指標とするキメに及ぼす影響を示す。 * : < 0.05 、*** : < 0.001 なお、(A) は、実測値を示し、(B) は、対応する投与日数の対照群を 100% とした場合の対照群に対する生菌投与群の比を表す。

【 図 1 4 】 実施例 6 の紫外線照射前投与期間の違いが面積比率を指標とするシワに及ぼす影響を示す。 ** : < 0.01 なお、(A) は、実測値を示し、(B) は、対応する投与日数の対照群を 100% とした場合の対照群に対する生菌投与群の比を表す。

【 図 1 5 】 実施例 6 の紫外線照射前投与期間の違いが経表皮水分蒸散量に及ぼす影響を示す。 ** : < 0.01 、**** : < 0.0001 なお、(A) は、実測値を示し、(B) は、対応する投与日数の対照群を 100% とした場合の対照群に対する生菌投与群の比を表す。

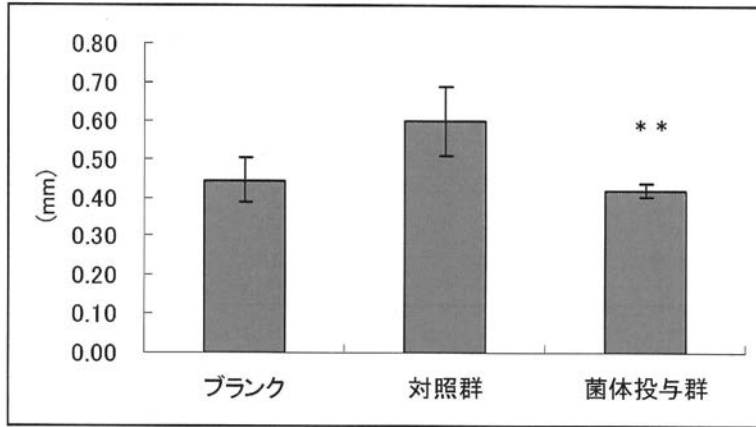
10

20

30

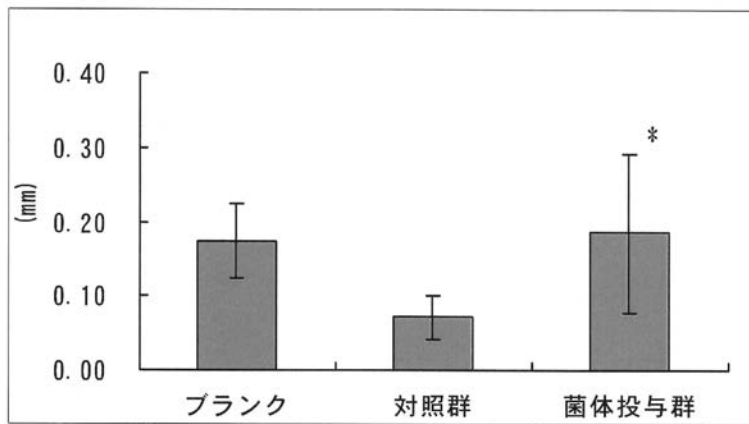
40

【 図 1 】



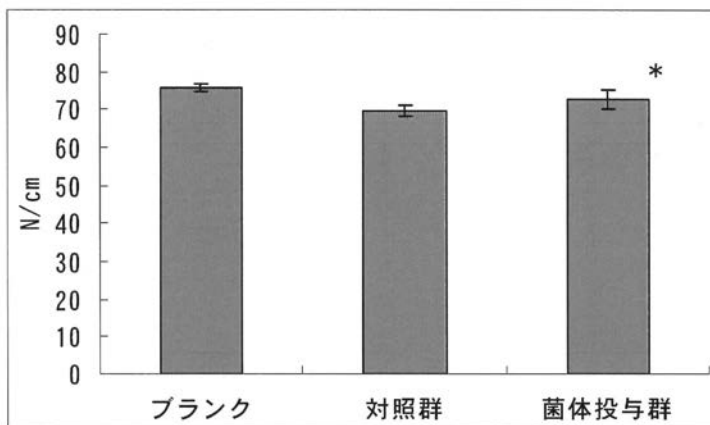
** : $p < 0.01$ (vs 対照群)

【 図 2 】



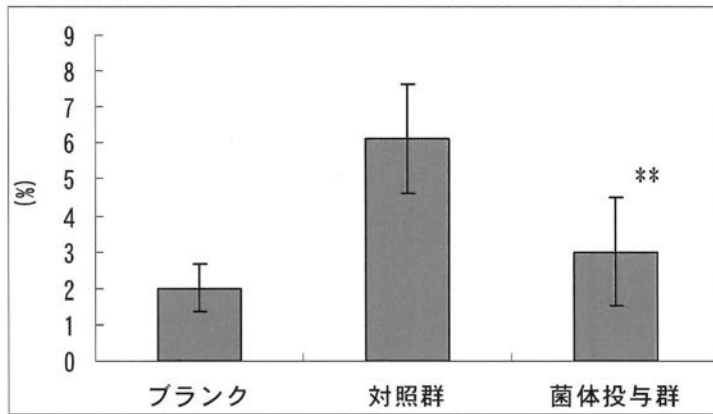
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 3 】



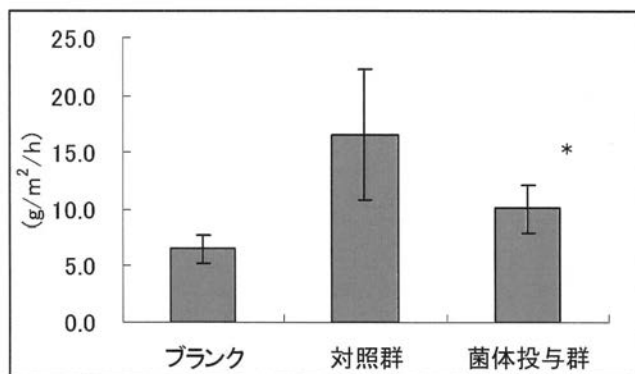
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 4 】



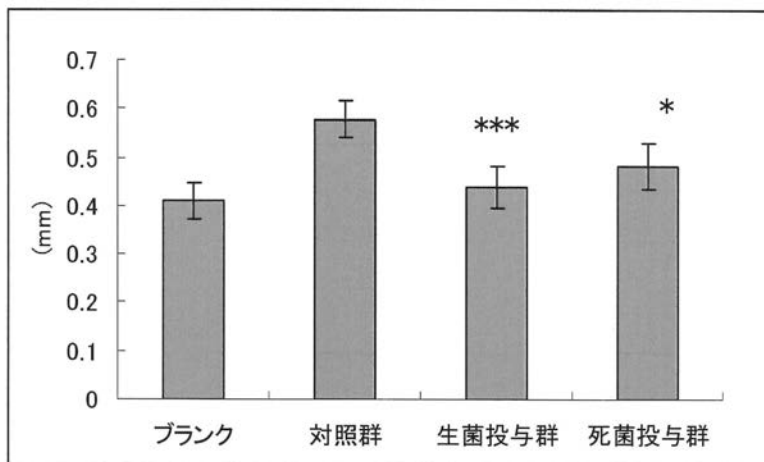
** : $p < 0.01$ (vs 対照群)

【 図 5 】



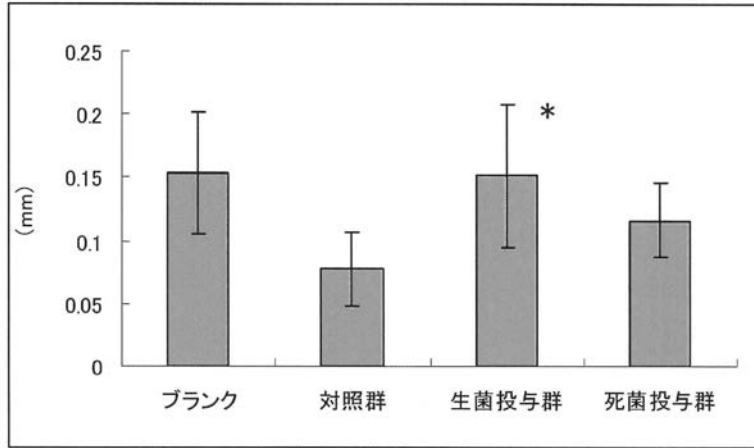
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 6 】



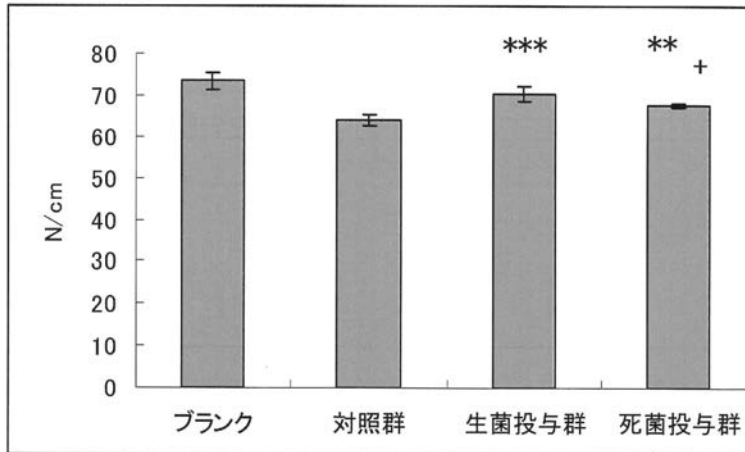
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)、*** : $p < 0.001$ (vs 対照群)

【 図 7 】



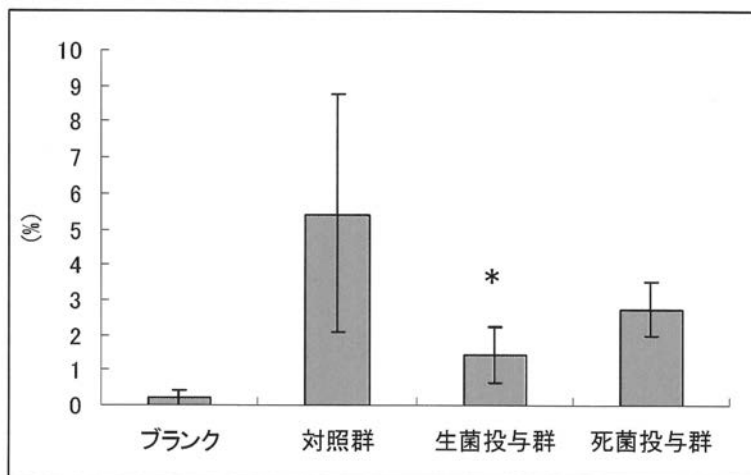
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【 図 8 】



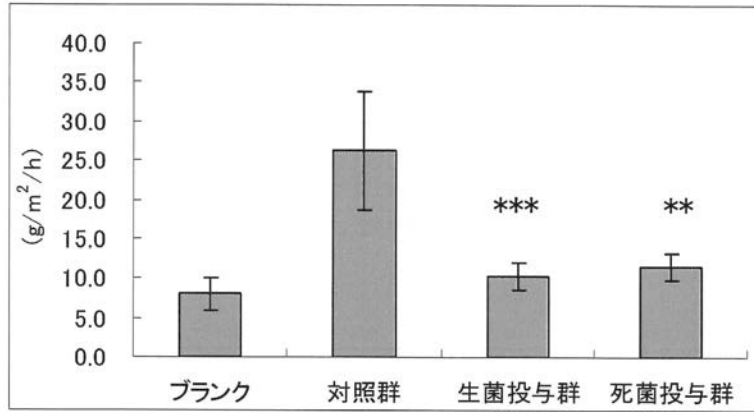
** : $p < 0.01$ (vs 対照群)、*** : $p < 0.001$ (vs 対照群)、+ : $p < 0.05$ (vs 生菌投与群)

【 図 9 】



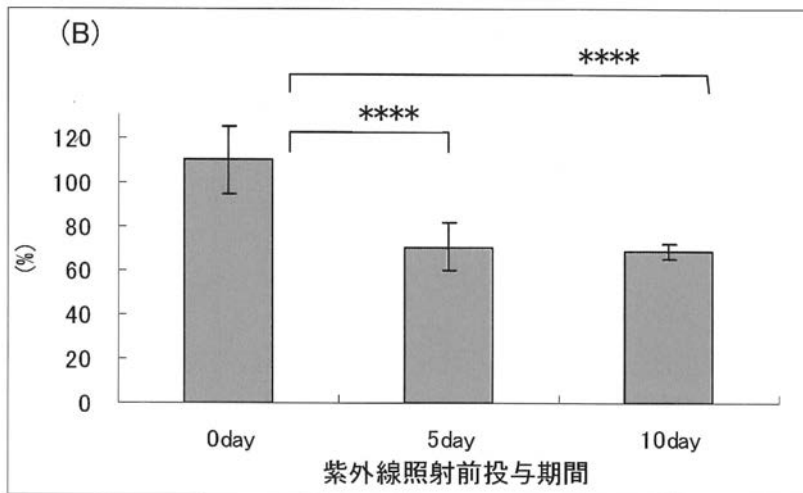
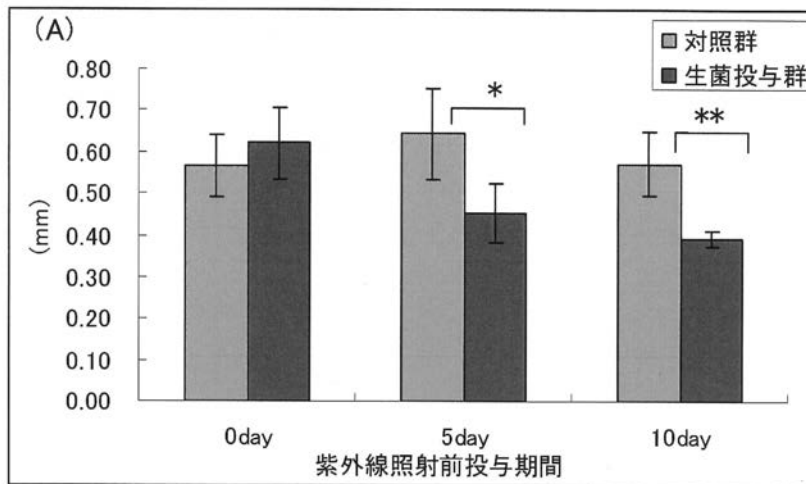
* : $p < 0.05$ (vs 対照群)

【図10】



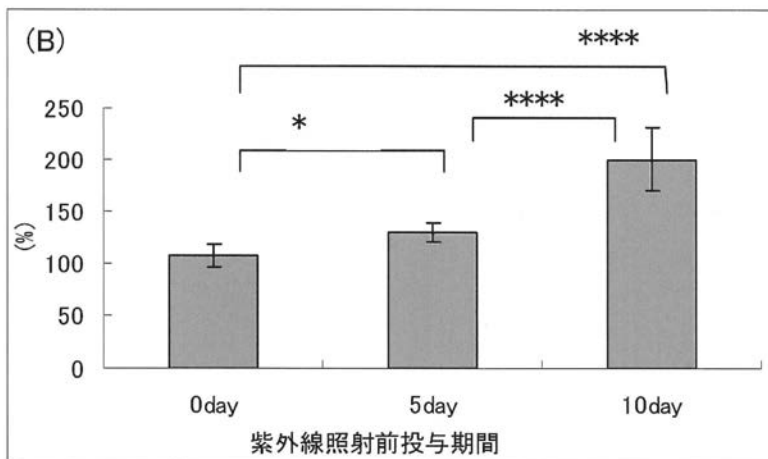
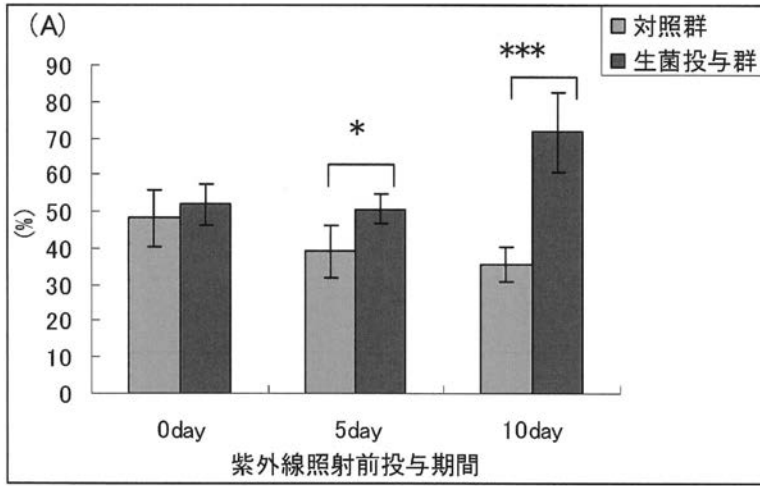
** : p<0.01 (vs 対照群)、*** : p<0.001 (vs 対照群)

【図11】



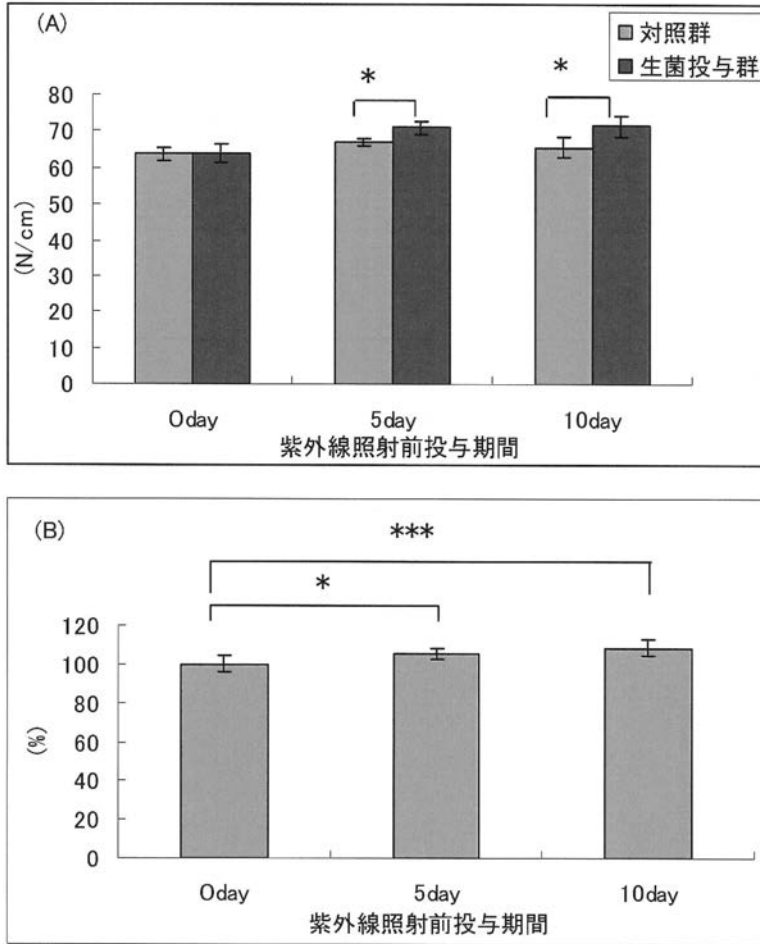
* : p<0.05、** : p<0.01、**** : p<0.0001

【 図 1 2 】



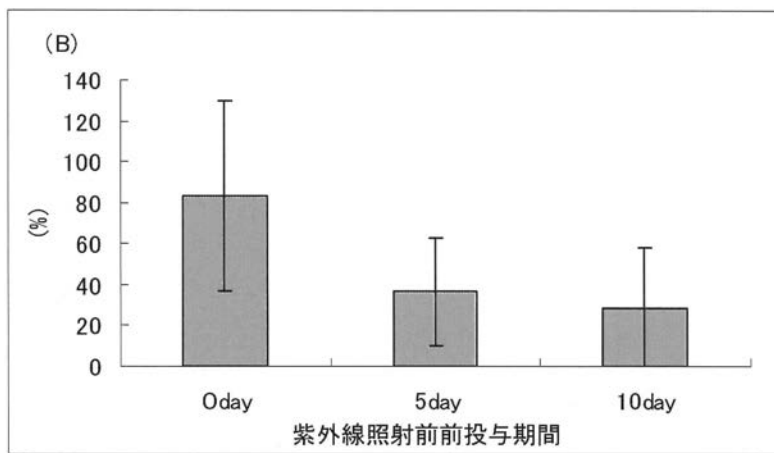
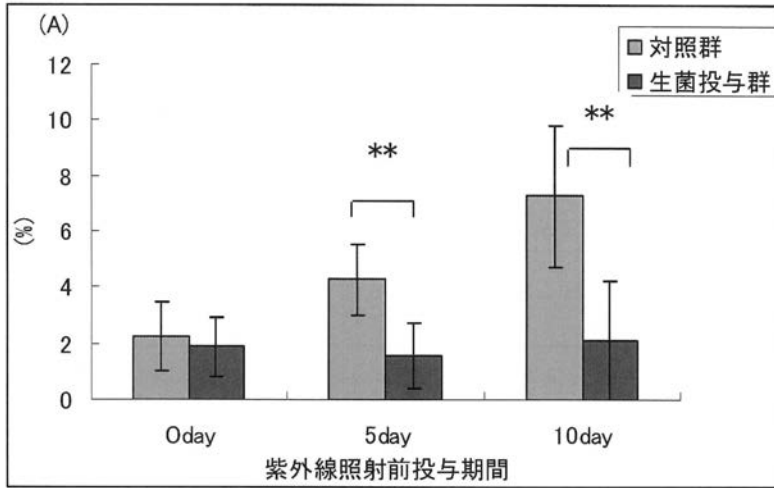
* : p<0. 05、 *** : p<0. 001、 **** : p<0. 0001

【 図 1 3 】



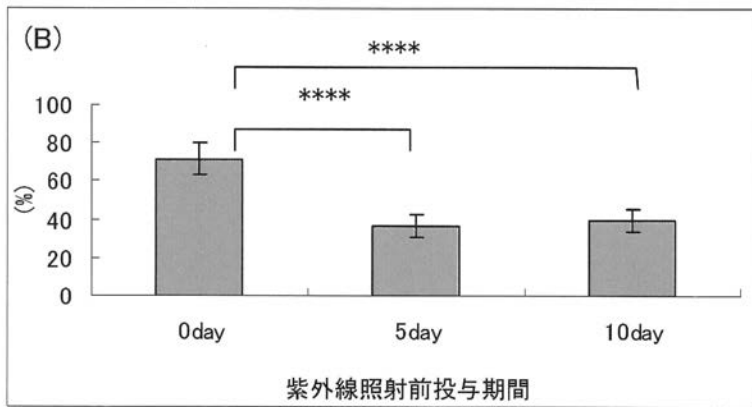
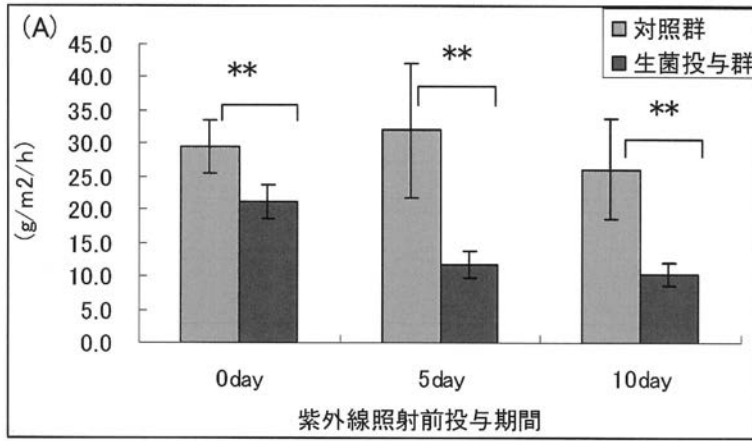
* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$

【 図 1 4 】



** : p<0.01

【 図 15 】



** : $p < 0.01$, **** : $p < 0.0001$

フロントページの続き

- (72)発明者 杉本 沙穂
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 曾根 俊郎
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 千葉 勝由
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内

審査官 小松 邦光

- (56)参考文献 特開2001-112437(JP,A)
特開2005-185234(JP,A)
特表2008-515792(JP,A)
特表2005-525348(JP,A)
服部和裕, et al., アトピー性皮膚炎患児に対するビフィズス菌末の投与が児の腸内細菌叢とアレルギー症状に与える影響の検討, アレルギー, 2003年 1月30日, Vol. 52, No. 1, p. 20-30

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/74

A61P 17/16

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamII)